

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-35687

(43) 公開日 平成7年(1995)2月7日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 21/31	Z	9118-2 J		
21/33		9118-2 J		
33/50	P	7055-2 J		
33/68		7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平5-201295	(71) 出願人	000005223 富士通株式会社 神奈川県川崎市中原区上小田中1015番地
(22) 出願日	平成5年(1993)7月22日	(72) 発明者	植田 秀文 神奈川県川崎市中原区上小田中1015番地 富士通株式会社内
		(72) 発明者	浅野 高治 神奈川県川崎市中原区上小田中1015番地 富士通株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 宇井 正一 (外3名)

(54) 【発明の名称】 生体高分子結晶の検索方法

(57) 【要約】

【目的】 簡便な装置を用い、溶液中の生体高分子の吸光特性を利用して生体高分子結晶を検出することができる、生体高分子結晶の検索方法を提供する。

【構成】 生体高分子の吸光特性を利用してその吸収域にある波長による透過光観察を行い、結晶化試料溶液中の生体高分子濃度分布をその透過率により測定して、測定分解能の大きさを最小画素単位として二次元画像化し、溶液部分に比べて極端に透過率が高いかもしくは低い範囲を検出して結晶を認識する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体高分子の吸光特性を利用してその吸収域にある波長による透過光観察を行い、結晶化試料溶液中の生体高分子濃度分布をその透過率により測定して、測定分解能の大きさを最小画素単位として二次元画像化し、溶液部分に比べて極端に透過率が高いかもしくは低い範囲を検出して結晶を認識することを特徴とする生体高分子結晶の検索方法。

【請求項2】 生体高分子の結晶が、試料溶液が入っていない状態の容器の透過率を100%とした場合に、結晶部分の透過率の分布が0~10%の最低レベルにあるかまたは溶液部分に比べて20%以上低い画素の集合体として検出される、請求項1記載の方法。

【請求項3】 生体高分子の結晶が、試料溶液が入っていない状態の容器の透過率を100%とした場合に、結晶部分の透過率の分布が0~25%の最低レベルの透過率をもつ画素と75%以上の最高レベルの透過率をもつ画素の集合体または溶液部分に比べて20%以上低い透過率をもつ画素と20%以上高い透過率をもつ画素の集合体として検出される、請求項1記載の方法。

【請求項4】 生体高分子の結晶が、結晶部分の透過率の分布が溶液部分と直線状の境界をもち、その境界の両側において20%以上透過率の異なる画素の集合体として検出される、請求項1記載の方法。

【請求項5】 生体高分子の結晶が、その周辺の溶液中に結晶に近いほど低濃度となっている生体高分子濃度の勾配を認識することにより検出される、請求項1記載の方法。

【請求項6】 生体高分子結晶の検索に際して、生体高分子が、気相と隔絶された状態の生体高分子溶液を徐々に結晶生成条件に移行させ、かつ、生体高分子濃度をほぼ均一に保持することにより、結晶化される請求項1記載の方法。

【請求項7】 生体高分子溶液が、この溶液中に固形の沈澱剤を入れ、沈澱剤をこの溶液中に溶出させ、拡散させることによって、徐々に結晶生成条件に移行される、請求項6記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、蛋白質、核酸等の生体高分子結晶の検索方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】蛋白質や核酸等の生体高分子の結晶化は、X線構造解析における最重要過程の1つであり、蛋白質等の生体高分子工学の基礎研究に欠かせないものである。これまで、蛋白質の結晶化は、基本的に実験者の手作業によって行われてきた。しかし、蛋白質の結晶化のための操作は、非常に微妙であるため、作業者の熟練が必要であった。また、蛋白質の結晶化のための条件は、蛋白質の種類によって異なり、各種の蛋白質にお

て独自に条件を検討しなければならない。蛋白質の結晶化に影響する要因は非常に多く、そのため検討作業ではトライ-アンド-エラーを繰り返して、膨大な数のスクリーニングを行うことになる。このとき、1つの試料ごとの観察を数回から多いときには十数回繰り返すことになり、観察作業に対して極めて多くの時間と労力を費やしている。しかも、得られる情報は結晶の形状や数といった程度のものであり、観察は単に結晶生成の有無を確認するだけのものとなっている。

【0003】また、蛋白質等の生体高分子の結晶化は、薬品や食品等の製造過程において、物質の単離、精製、高純度化などに利用されている。このような工程は、製品の品質の向上、ひいては信頼性の確保に直接影響してくる部分である。このほか、生体高分子の結晶化は、化粧品等の製造過程でも多く利用されている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】結晶化条件の検討をトライ-アンド-エラーに頼らなければならないことの原因としては、生体高分子結晶の成長機構が、ほとんど不明であることが挙げられる。これは、生体高分子結晶の作製を目的とした研究者が通常得ることのできる観察情報が、結晶の形状や個数のような結晶生成の確認程度のものであることから、機構解析に必要なデータが根本的に不足していることに起因する。

【0005】結晶化機構の解明ならびに結晶化条件の選択に有効な情報の取得、例えば、蛋白質濃度分布の測定などは一般には行われておらず、また測定装置自体も紫外線顕微鏡、光干渉測定装置などの高価なものが多かった。従って、本発明は、簡便な装置を用い、溶液中の生体高分子の吸光特性を利用して生体高分子結晶を検出することができる、生体高分子結晶の検索方法を提供しようとするものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記課題を解決するため、生体高分子の吸光特性を利用してその吸収域にある波長による透過光観察を行い、結晶化試料溶液中の生体高分子濃度分布をその透過率により測定して、測定分解能の大きさを最小画素単位として二次元画像化し、溶液部分に比べて極端に透過率が高いかもしくは低い範囲を検出して結晶を認識することを特徴とする生体高分子結晶の検索方法を提供する。

【0007】蛋白質等の生体高分子の吸光特性を利用して、その吸収域にある波長の光により試料溶液中に生成した結晶を透過光観察し、得られたデータを二次元画像化すると、結晶部分と溶液部分とでは画素の透過率および分布の状態が明らかに異なっている。本発明の方法では、この画素の透過率の分布を認識することによって結晶を検出するのである。

【0008】結晶のエッジ部分は、試料溶液が入っていない状態の容器の透過率を100%とした場合に、透過

率が0~10%の最低レベルであるか、または溶液部分に比べて20%以上低くなる。従って、結晶の大きさが測定分解能の1~2倍であれば、結晶部分は透過率が0~10%の最低レベルであるかまたは溶液部分に比べて20%以上低い画素の複数個の集合体として認識される。結晶の大きさが測定分解能の5倍程度になると、透過率レベルが溶液部分よりも低い画素(0~10%)の集まりの中に透過率レベルが極端に高い画素(90%以上)が現れる。これは、蛋白質結晶の屈折作用の集光効果によるものと考えられる。測定分解能の10倍以上の大きさにになると結晶のエッジは直線状に認識されるようになる。結晶が測定分解能の20倍以上の大きさになると、結晶部分に透過率が極端に高い画素が現れなくなる場合もある。また、結晶の面ごとにほぼ均一な透過光を示す場合もあり、結晶を多面的に捕らえることができる。

【0009】本発明の方法では、生体高分子の結晶は、また、試料溶液が入っていない状態の容器の透過率を100%とした場合に、結晶部分の透過率の分布が0~25%の最低レベルの透過率をもつ画素と75%以上の最高レベルの透過率をもつ画素の集合体または溶液部分に比べて20%以上低い透過率をもつ画素と20%以上高い透過率をもつ画素の集合体として検出される。あるいは、生体高分子の結晶は、結晶部分の透過率の分布が溶液部分と直線状の境界をもち、その境界の両側において20%以上透過率の異なる画素の集合体として検出される。

【0010】結晶成長に伴って結晶周辺の溶液に生体高分子濃度の勾配ができるため、この勾配を認識することによっても、結晶の成長状態を確認することができる。生体高分子結晶の検索に際して、生体高分子は、気相と隔絶された状態の生体高分子溶液を徐々に結晶生成条件に移行させ、かつ、生体高分子濃度をほぼ均一に保持することにより、結晶化されてもよい。例えば、生体高分子の溶液中に固形の沈澱剤を入れ、沈澱剤をこの溶液中に溶出させ、拡散させることによって、生体高分子溶液を徐々に結晶生成条件に移行させることができる。

【0011】図1に示すように、例えば、硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール等の固形の沈澱剤を、凹型で内容量が正確に明らかになっている結晶化容器の底部に入れる(図1(1))。次いで、蛋白質試料の溶液を容器内に溢れる寸前まで満たす(図1(2))。容器に蓋をするときに蛋白質試料溶液の一部(表面張力による容器外にはみ出している部分)を溢れさせることにより、容器内の空気を排除する(図1(3))。この結晶化容器内に密閉された蛋白質試料溶液を、一定温度で静置する(図1(4))。静置の間に固形の沈澱剤が溶解し、蛋白質試料溶液中に拡散することにより、溶液内の沈澱剤濃度が上昇して蛋白質の溶解度が低下し、試料溶液は結晶化条件となる(図1(5))。

【0012】

【実施例】以下、実施例により、本発明をさらに詳しく説明する。

#### 実施例1

本発明の方法の実施例として、紫外光による蛋白質結晶の検索を行った。検索装置として用いた紫外線顕微鏡は、光源部(紫外光の発生、波長変換および照射装置)、測定部(試料固定台、透過光量検出器および走査装置)、制御部(データ記録および処理装置、画像化および画像処理装置、および光源図および測定部の制御装置)からなる。蛋白質試料にはリゾチームおよびリボヌクレアーゼSを用い、試料容器として石英ガラス製のものを用いた。

【0013】(1) リゾチームの結晶検索

リゾチームの結晶を紫外線顕微鏡により観察した。測定分解能25 $\mu$ mで経時的に結晶成長を観察したところ、初期結晶核(長さ50 $\mu$ m)の検出、成長した蛋白質結晶(長さ0.1~1.0mm)および結晶成長に伴う蛋白質濃度勾配が観察された。

【0014】リゾチームは、0.1M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液中で、pH4.2、塩化ナトリウム4~5%、リゾチーム濃度2%の条件で結晶化された。また、結晶化試料を石英ガラス製の容器に保存した。試料溶液に波長280~290nmの紫外光を照射し、フォトマルを走査して、その透過率を、試料溶液が入っていない容器の透過光量を100%として、測定した。測定データを、モニタ上に二次元画像化して観察した。

【0015】初期結晶核の検出では、30 $\mu$ m程度の微小結晶は、最初、透過率が0~5%の1つの画素で観察され、これはアモルファス状蛋白質や測定ノイズとほとんど区別がつかないが、50 $\mu$ m程度に成長すると画面上では数画素の集合体として観察される(図2)。このときの結晶部の透過率は、最低レベル(0~5%)であった。

【0016】結晶がある程度の大きになると、画面上の結晶部分の透過率レベルに変化が現れる。0.1mm以上になると、エッジ部分は最低レベルの透過率であるが、それ以外の部分は透過率レベルが最高(90~100%)になる(図3)。すなわち、結晶部分は最低もしくは最高の透過率レベルをもつ集合体という極めて特異なパターンとなる。0.3mm以上の大きさの結晶では、結晶部と溶液部にはっきりとした直線状の境界が見られるようになり、この境界の検出によっても、結晶の認識が可能である(図4)。さらに大きく成長した結晶では、結晶部分全体の透過率が最低レベルとなるものもある(図5)。また、結晶の各面単位で透過率が異なっている場合もある(図6)。これらは、いずれも、結晶に特有の画素分布状態であり、検出するときの重要な目印となる。

【0017】結晶の成長に伴って、結晶近傍の溶液部

に、蛋白質濃度の勾配が現れる(図5および図6)。この勾配は、結晶に近い部分ほど濃度が低くなっており、試料溶液の初期蛋白質濃度から最大20%程度減少している場合がある。このような結晶周辺の蛋白質濃度勾配は、結晶を認識するための一手段となる。また、これは結晶の成長機構の解析データとしても有効である。

【0018】(2) リボヌクレアーゼSの結晶検索  
リボヌクレアーゼSの結晶を紫外線顕微鏡により観察した。測定分解能25 $\mu$ mで経時的に結晶成長を観察したところ、初期結晶核(長さ50 $\mu$ m)の検出、成長した蛋白質結晶(長さ0.1~1.0mm)および結晶成長に伴う蛋白質濃度勾配が観察された。

【0019】リボヌクレアーゼSは、0.1M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液中で、pH6.1、塩化セシウム3M、硫酸アンモニウム40%飽和濃度、リボヌクレアーゼS濃度3.75%の条件で、結晶化された。また、結晶化試料の保存容器として、石英ガラス製のものをを用いた。試料溶液に波長280~290nmの紫外光を照射し、フォトマルを走査して、その透過率を、試料溶液が入っていない容器の透過光量を100%として、測定した。測定データをモニタ上に二次元画像化して観察した。

【0020】上記の条件で観察を行ったところ、30 $\mu$ m程度の微小結晶の確認、エッジ部分の透過率の極端な低下、大きさ0.1mmの結晶の、最低もしくは最高の透過率レベルをもつ画素の集まりとしての検出、エッジの直線状境界としての認識など、上記(1)の場合と同様の結果を得ることができた。

## 実施例2

### (1) リゾチームの結晶化

1. 固形の塩化ナトリウム4mgを、先ず、内容量100 $\mu$ lの凹型容器に量り取る。

【0021】2. 次に、ニワトリ卵白リゾチームを2%含む0.1M酢酸-酢酸ナトリウムのpH4.2の緩衝液を容器内に溢れる寸前まで満たし、容器に蓋をするときに蛋白質溶液の一部を溢れさせることにより、容器内の空気を排除して試料溶液を密閉する。

3. この状態で20℃の雰囲気下に静置保存し、24時間後に観察した。実験を合計5回行ったところ、5つの試料のうち4つの試料で0.3mm角以上の正方晶系結晶がそれぞれ3~5個成長しているのが確認された。

【0022】比較のため、静置パッチ法でリゾチームの結晶化を行った。塩化ナトリウム含有量4.5%、ニワトリ卵白リゾチーム含有量2%および0.1M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液pH4.2に調製した試料溶液を100 $\mu$ lづつ5つの容器に分注した後、密閉した。この状態で20℃の雰囲気下に静置保存し、24時間後に観察すると、5つの試料のうち2つの試料で0.3mm以上の結晶がそれぞれ2~3個づつ確認された。その他の試料では、0.1mm以下の微結晶が生成したのみであっ

た。この結果から、本発明の方法に用いる結晶化方法は、大きな結晶を高い再現性で得るのに適しているといえる。

【0023】(2) シトクロムCオキシダーゼの結晶化  
1. 固形のBrij-35の100mgを、内容量100 $\mu$ lの凹型容器に量り取る。

2. 次に、牛心筋シトクロムCオキシダーゼを7%含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH7.4を、容器内に、蛋白質溶液が溢れる寸前まで満たし、容器に蓋をするときに蛋白質溶液の一部を溢れさせることにより、容器内の空気を排除しながら試料溶液を密閉する。

【0024】3. この状態で20℃の雰囲気下に静置保存し、2週間後に観察した。実験を合計5回行ったところ5つの試料のうち4つの試料で0.3mm角以上の六方晶系結晶がそれぞれ2~5個成長しているのが確認された。比較のため、静置パッチ法でシトクロムCオキシダーゼの結晶化を行った。Brij-35含有量10%、シトクロムCオキシダーゼ含有量7%および10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH7.4に調製した試料溶液を100 $\mu$ lづつ5つの容器に分注した後、密閉した。この状態で20℃の雰囲気下に静置保存し、24時間後に観察してみると、5つの試料全てにおいて結晶は生成しておらず、液表面には変性していると思われる蛋白質の白濁が生じていた。また、同様の組成に調製した試料溶液を内容量100 $\mu$ lの容器内に密閉し、気液界面を排除した状態で20℃の雰囲気下に静置保存した。一週間後に観察してみると、5つの試料のうち1つの試料で0.1mm程度の微結晶が多数観察された。その他の試料では、蛋白質の一部がアモルファス状に沈澱しているのみで、結晶は生成していなかった。

【0025】以上から、界面変性を非常に起こしやすく、また通常の静置パッチ法では再現性があまり高くない試料であるシトクロムCオキシダーゼを結晶化するために、本発明の方法で用いる結晶化方法が非常に有用であるといえる。

【0026】

【発明の効果】本発明の方法によれば、下記の効果が達成される。

(1) 生体高分子濃度の分布状態によって結晶を検出するため、結晶の数や形状だけでなく、生体高分子濃度分布などの成長機構の解析に必要なデータを取得することができる。

【0027】(2) 生体高分子結晶を紫外線により透過光観察すると特異的な二次元吸光パターンとなるため、このパターンの検出により結晶の認識が可能である。

(3) 可視光観察よりも低い分解能で結晶が検出できるため、光学系の設計が簡素化でき、また保存する情報量が膨大にならない。このため、観察作業を自動化する際に有利である。

【0028】(4) 試料溶液を容器内に密閉し、気相を

排除した状態で徐々に結晶化条件に移行させることによって、蒸気拡散法や静置バッチ法に存在する界面変性の危険性を排除することができる。また、蛋白質濃度は常にほぼ均一であるため、自由界面拡散法のように蛋白質濃度の希薄化により蛋白質が変性することがない。

(5) 沈澱剤が蛋白質溶液中に拡散する過程において、その濃度勾配が形成される。沈澱剤の拡散は、固形沈澱剤の溶出という段階を経て生じるため、非常にゆっくりと進行する。このため、形成される濃度勾配は長時間にわたって存在することになる。従って、静置バッチ法のように条件がピンポイントとならず、結晶核形成頻度が増大する。

【0029】(6) 結晶化しようとする蛋白質試料と使用する結晶化方法には相性のようなものが存在するため、これまで結晶化に成功しなかった蛋白質試料でも、\*

\* 本方法を用いることにより結晶化できる可能性が生じる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法に有用な結晶化方法を説明する図である。

【図2】蛋白質試料の結晶化の一過程における紫外線透過光を二次元画像化したときの画像である。

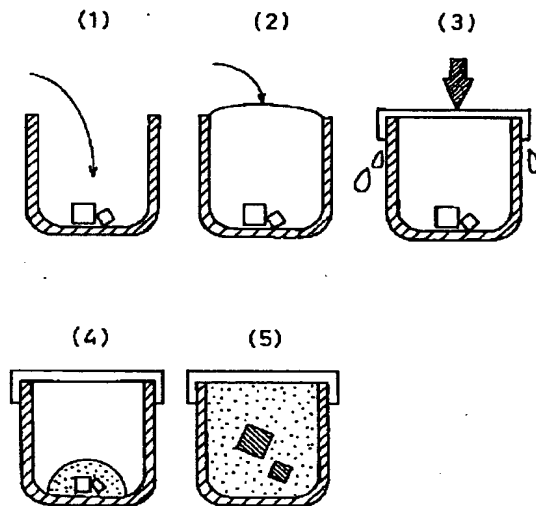
【図3】蛋白質試料の結晶化の他の一過程における紫外線透過光を二次元画像化したときの画像である。

10 【図4】蛋白質試料の結晶化の他の一過程における紫外線透過光を二次元画像化したときの画像である。

【図5】蛋白質試料の結晶化の他の一過程における紫外線透過光を二次元画像化したときの画像である。

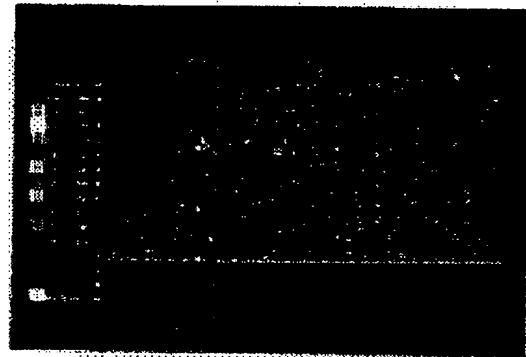
【図6】蛋白質試料の結晶化の他の一過程における紫外線透過光を二次元画像化したときの画像である。

【図1】



【図2】

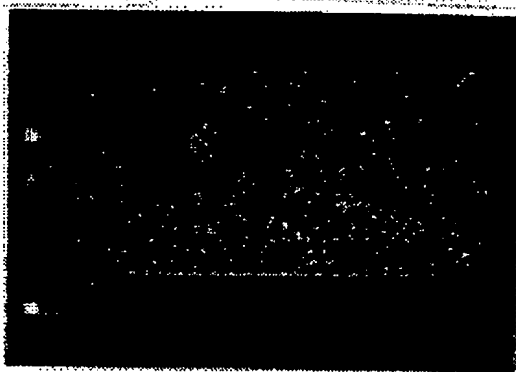
図2代用写真



写真

【図3】

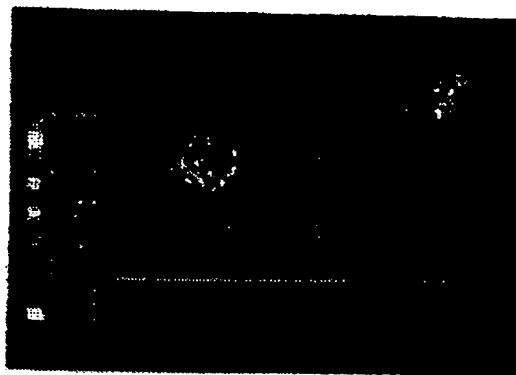
図面代用写真



写真

【図4】

図面代用写真



写真

【図5】

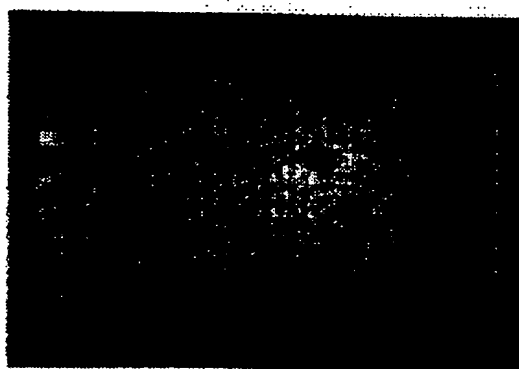
図面代用写真



写真

【図6】

図面代用写真



写真